

**Kourilsky et al., German Patent
Application No. DE 29 15
082A1**

51

Int. Cl. 2

G U 1 N 33/16

19

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

DE 29 15 082 A 1

11

Offenlegungsschrift 29 15 082

21

Aktenzeichen: P 29 15 082/1

22

Anmeldetag: 12. 4. 79

33

Offenlegungstag: 31. 10. 79

31

Unionspriorität:

32 33 31

13. 4. 78 Frankreich 7810975

54

Bezeichnung:

Verfahren und Reagenzatz zum Nachweis und zur Charakterisierung von Nukleinsäuren und ihren Sequenzen

71

Anmelder:

Institut Pasteur, Paris

74

Vertreter:

Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr. rer. nat.; Vossius, D., Dipl.-Chem.;
Hiltl, E., Dipl.-Chem. Dr. rer. nat.; Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr. rer. nat.;
Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr. rer. nat.; Pat.-Anwälte, 8000 München

72

Erfinder:

Kourilsky, Philippe; Avrameas, Stratis; Cami geb. Contamine, Brigitte;
Guesdon, Jean-Luc, Paris

29 15 082 A 1

5

u.Z.: P 108 (DV/nk/ke)

Case: PL-0053 79 05

12. April 1979

Institut Pasteur

10 Paris, Frankreich

Verfahren und Reagenzsatz zum Nachweis und zur Charakterisierung
von Nukleinsäuren und ihren Sequenzen

15

Priorität: 13. April 1978, Frankreich, Nr. 78 10975

20

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zum Nachweis und zur Charakterisierung einer bestimmten Nukleinsäure-Sequenz oder eines bestimmten Nukleinsäure-Fragments, insbesondere eines Gens, auch der gesamten Nukleinsäure in einer Probe eines Nukleinsäurekomplexes durch Zusammenbringen der Probe, gegebenenfalls nach vorherigen Denaturieren der untersuchten Nukleinsäure, mit einem eine komplementäre Nukleinsäure enthaltenden Indikator, der hybridisierbar mit der gesuchten Nukleinsäure oder deren Sequenz ist, dadurch gekennzeichnet, daß man als Indikator einen durch Bindung an ein Enzym vor oder nach der Hybridisierungsreaktion chemisch modifizierten Indikator verwendet wobei die gegebenenfalls anwesende Nukleinsäure oder deren Sequenz durch die Aktivität des so umgewandelten Hybridisierungsprodukts aus Indikator und Nukleinsäure oder deren Sequenz als Substrat für ein Enzym nachgewiesen werden kann.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

1 man das Enzym im Hinblick auf seine Fähigkeit, auf ein far-
biges Substrat einzuwirken, auswählt, und daß man die Umwand-
lungsrates des Substrats, die dem Anteil der gesuchten Nuklein-
säure oder deren Sequenz in der Ausgangsprobe korrelierbar ist,
5 durch optische oder analoge Analyse bestimmt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,
daß man den Indikator durch eine chemische Gruppe modifiziert,
die mit dem Enzym oder einem Molekül, das stabil mit dem Enzym
10 verbunden ist, einen stabilen Komplex bilden kann.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß
man sowohl als chemische Gruppe als auch als Molekül Biotin
oder Avidin verwendet.

15 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß
man als Enzym die β -Galactosidase verwendet.

6. Verfahren nach Anspruch 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet,
20 daß man zunächst die Hybridisierung, dann die Bindung zwischen
dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und
dem Enzym durchführt und anschließend den gegebenenfalls im
Überschuß vorhandenen nicht hybridisierten Indikator abtrennt
bzw. abbaut.

25 7. Verfahren nach Anspruch 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet,
daß man zunächst die Hybridisierung und anschließend nach Ab-
trennung bzw. Abbau des gegebenenfalls im Überschuß vorhan-
denen nicht hybridisierten Indikators die Bindung zwischen
30 dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und
dem Enzym durchführt.

8. Reagenzsatz zur Durchführung des Verfahrens gemäß Ansprüche 1 bis
7, dadurch gekennzeichnet, daß er folgende Bestandteile aufweist:

35 a) mindestens einen bestimmten Indikator aus einer RNA oder
einer einzelsträngigen DNA, die charakteristisch ist für
eine gesuchte Nukleinsäure oder deren Sequenz, wobei
dieser Indikator im Hinblick auf seine Bindung mit einem

- 1 Enzym chemisch modifiziert ist,
- b) das gegebenenfalls modifizierte Enzym, das für die
Bindung mit dem Indikator verwendet wird,
- 5 c) ein insbesondere farbiges Substrat, das für das Enzym
spezifisch ist,
- d) Reagentien, die für die Zellyse, insbesondere bei der
10 Untersuchung von Blut, und für die Extraktion von Nuk-
leinsäuren erforderlich sind.
9. Reagenzsatz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß
der Indikator aus einer RNA an Biotin gebunden ist und daß das
15 Kupplungsprodukt aus Avidin und einem Enzym die β -Galactosida-
se als Enzym enthält.
10. Komplex aus einem Enzym, das insbesondere durch
20 seine Fähigkeit mit einem farbigem Substrat zu reagieren nach-
weisbar ist, und einem RNA- oder DNA-Indikator, wobei die Bin-
dung direkt oder mittels eines komplexbildenden Mittels erfolgt.
11. Komplex aus einem Enzym, das insbesondere durch seine
25 Fähigkeit mit einem farbigem Substrat zu reagieren nachweis-
bar ist, und mindestens einem chemischen Molekül, wobei der
ganze Komplex an einen gegebenenfalls modifizierten RNA- oder
DNA-Indikator gebunden werden kann.
- 30 12. Komplex nach Anspruch 11 enthaltend β -Galactosidase als
Enzym und Avidin oder Biotin als chemische Substanz.

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und gegebenenfalls zur Charakterisierung einer Nukleinsäure oder einer Sequenz derselben, in einer diese möglicherweise enthaltenden Probe. Sie betrifft ferner die zur Durchführung des Verfahrens erforderlichen Reagenzien und schließlich die Verwendung eines solchen Verfahrens, beispielsweise zur raschen Diagnostizierung in vitro, ob in einer biologischen Probe menschlicher oder tierischer Herkunft bestimmte Nukleinsäurepartikel etwa infektiösen Charakters vorhanden sind oder ob ein bestimmtes Gen aus dem normalen Erbgut des Wirts unverändert ist oder nicht.

Jede biologische Probe, beispielsweise Blut, das jedem Lebewesen entnommen werden kann, enthält verschiedene Nukleinsäuren in außerordentlicher Reichhaltigkeit. Dies trifft auch für verschiedene Sequenzen zu, beispielsweise zahlreiche Gene, die jede einzelne Nukleinsäure in diesen Proben enthalten kann. Daher kann der Genetiker auf große Schwierigkeiten beim Aufspüren oder bei der Charakterisierung von bestimmten Nukleinsäuren in einer Probe stoßen. Die Schwierigkeiten werden noch größer, wenn es darum geht, die Anwesenheit bestimmter Fragmente, beispielsweise der in diesen Nukleinsäuren enthaltenen Gene, zu charakterisieren.

Um eine einzelne Nukleinsäure oder einzelne Gene - beispielsweise im Hinblick auf Studien der Organisation genetischer Sequenzen der DNA, in der sie enthalten sind - zu charakterisieren, benötigt man zunächst eine mit dieser Nukleinsäure angereicherte, aus der untersuchten Probe erhaltene Fraktion.

Zu diesem Zweck wurden bereits Anreicherungsverfahren vorgeschlagen, die sich die Hybridisierungsreaktionen zwischen der gesuchten Nukleinsäure bzw. dem Gen und einem Indikator zunutze machen, sofern ein solcher Indikator verfügbar ist und

- 1 die erhaltenen Hybride sodann von der Probe abgetrennt werden können, beispielsweise durch differentielle Sedimentation aus einer Lösung mittels Ultrazentrifugieren.
- 5 Solche Indikatoren wurden bereits beschrieben: es handelt sich dabei im allgemeinen um Ribonukleinsäuren (RNA), beispielsweise solche, die mittels genetischer Transkription von Strukturgenen erhalten wurden. Die Strukturgene sind Bestandteile der DNA der einzelnen Zellorganismen, aus denen sie stammen. Die DNA ist demnach ge-
10 eignet, ihrerseits in die Proteine, für welche die Strukturgene codieren, "übersetzt" zu werden. Es ist bekannt, daß die RNA-Nukleotid-Sequenzen zu der Sequenz der DNA, von der sie abstammen, komplementär sind. Dies zeigt sich
15 in der Eigenschaft der RNA, gemischte Hybride mit den entsprechenden Sequenzen der zugehörigen DNA zu bilden, die zuvor denaturiert worden ist, soweit diese anfangs doppelsträngig war, beispielsweise nach Inkubation bei hoher Ionenstärke und erhöhter Temperatur oder in basischem Milieu.
- 20 Es wurde vorgeschlagen, den Nachweis von gebildeten Hybriden mit Hilfe einer radioaktiven Markierung der Gene selbst oder der RNA-Indikatoren vorzunehmen. Die Durchführung dieser Methoden ist jedoch nicht einfach, und außerdem ist es dabei nicht immer möglich, die Gene innerhalb der DNA ausreichend
25 zu lokalisieren.

Um die untersuchten Gene in der sie enthaltenden DNA besser lokalisieren zu können und eine Methode zur Bildung von mit bestimmten DNA-Segmenten angereicherten Fraktionen - aus-
30 gehend von derselben DNA - zu entwickeln, haben Manning et al eine Methode zum physiko-chemischen Nachweis dieser Gene vorgeschlagen. Diese Methode besteht aus der chemischen Modifizierung des RNA-Indikators durch Anheftung von Biotingruppen, d.h. Derivaten des Cytochrom C. Diese Biotingruppen heften
35 sich durch Brückenbildung bei der Hybridisierung an die DNA an und sind nun physikalisch im Elektronenmikroskop als Staubteilchen, die aus submikroskopischen Kügelchen von

1 einem Durchmesser von 60 nm bestehen, insbesondere auf einem
Untergrund von Polymethacrylsäureester nachweisbar. Die Kügelchen wurden
zuvor chemisch modifiziert und kovalent an Avidin-Moleküle gebunden.
Diese Methode ist in "A New Method of in situ Hybridization",
5 Chromosoma, Springer Verlag (Berlin), Bd. 53 (1975), S. 107
bis 117 und in "A Method for Gene Enrichment Based on the
Avidin-Biotin Interaction, Application to the Drosophila
Ribosomal RNA Genes", Biochemistry, Bd. 16 (1977), Nr. 7,
S. 1364 - 1369 beschrieben.

10

Die Inkubation der Hybride, die durch Biotin und Avidin modifi-
ziert sind, macht es möglich, die Stelle der gesuchten Gene
in der sie enthaltenden DNA zu "markieren" und sie innerhalb
der globulären Struktur der DNA nachzuweisen. Diese ist ebenfalls
15 im Elektronenmikroskop sichtbar infolge der sehr starken
nicht kovalenten Interaktionen, die nach wie vor an den Stellen
herrschen, die frei von Biotin und Avidin geblieben sind.

Diese Methode ist jedoch kaum dazu geeignet,
20 rasch zu bestimmen, ob derartige Gene bzw. DNA in einer biologischen
Probe menschlicher oder tierischer Herkunft anwesend sind oder
nicht. So ist beispielsweise eine rasche Diagnose einer In-
fektion, von welcher der Wirt möglicherweise befallen ist, oder
der Tatsache, ob ein Gen oder beispielsweise eine DNA-Sequenz
25 in diesem Wirt unverändert geblieben ist oder nicht nach der
Methode schwer möglich.
Aufgabe der Erfindung ist es Nachweis- und sogar Charakterisie-
rungsmethoden zur Verfügung zu stellen, die mit einfachen Mit-
teln von Laboranten ohne besondere Ausbildung angewandt werden können.
30 Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

Die Erfindung betrifft somit den in den Patentansprüchen gekenn-
zeichneten Gegenstand.

35 Natürlich darf die chemische Modifizierung, die gegebenenfalls
zusätzlich stattfindende Hybridisierung des Indikators mit der ge-
suchten DNA-Sequenz bzw. dem DNA-Fragment nicht behindern.

- 1 Für den Fachmann liegt es auf der Hand, daß mit dieser Methode die Möglichkeit gegeben ist, rasch festzustellen, ob in einer biologischen Probe das DNA-Gen bzw. DNA-Fragment, das dem verwendeten Indikator entspricht, vorhanden ist oder nicht, und
- 5 dies sogar bei Anwesenheit einer großen Anzahl anderer Nukleinsäuren. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, daß durch den Nachweis aufgrund der enzymatischen Aktivität, wobei das Enzym durch das Substrat an das Hybrid gebunden ist, umfassende Anwendungsmöglichkeiten gegeben sind.
- 10 Nach einer ausreichenden Reinigung des Hybrids ist es sogar möglich, Angaben über die Konzentration der gesuchten DNA in der untersuchten biologischen Probe bzw. über die Anzahl der Kopien des gesuchten Gens in der gereinigten DNA zu erhalten, und zwar durch Bestimmung der Enzymaktivität.

15

- Bei einer zu untersuchenden Nukleinsäureprobe kann man zunächst die Hybridisierung durchführen. Dann kann die Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym stattfinden. Man kann vor Bestimmung der
- 20 Enzymaktivität den gegebenenfalls im Überschuß vorhandenen nicht hybridisierten Indikator bzw. das Überschüssige mit dem Indikator nicht umgesetzte Enzym abtrennen oder abbauen.

- Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann die Ab-
- 25 trennung oder der Abbau des überschüssigen nicht hybridisierten Indikators gegebenenfalls vor der Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym erfolgen.

- 30 Der spezifische Indikator kann aus RNA oder einzelsträngiger DNA bestehen. Verwendet man eine ursprünglich doppelsträngige DNA (oder RNA) als Indikator, so muß er vorher durch an sich bekannte Methoden denaturiert worden sein.
- 35 Führt man eine chemische Modifizierung des Indikators mit Biotin durch, so kann man die Methode nach Manning et al (a.a.O.)

1 mittels des Cytochrom C (durchschnittlich ein Molekül
Biotin pro etwa 100 Nukleotide) anwenden.

Vorzugsweise verwendet man zum Markieren des Hybrids durch
5 das Enzym den Komplex/^(Kupplungsprodukt) der sich nach der Methode von Avrameas
(beschrieben in Immunochemistry, Bd. 6 (1969), S. 43 - 52)
aus Avidin und dem Enzym, insbesondere der β -Galactosidase, ergibt,

Man kann natürlich auch andere chemische Modifizierungsmethoden
10 für den Indikator und gegebenenfalls das Enzym im Hinblick auf deren
Bindung, vorzugsweise nach der Hybridisierungsreaktion, ver-
wenden und kann die modifizierenden Mittel für Indikator und
Enzym umgekehrt verwenden.

15 Es kommen noch andere Paare von modifizierenden Mitteln für
Indikator und Enzym in Frage, für die nachstehend einige Bei-
spiele angegeben sind. Das erste dieser Mittel wird vorzugs-
weise jeweils zur chemischen Modifizierung des Indikators und
das zweite zur chemischen Modifizierung des Enzyms eingesetzt.
20 Der Indikator kann beispielsweise nach einer bekannten Methode
durch Metallionen, wie Quecksilberionen, modifiziert werden,
und der Nachweis wird mittels eines Enzyms durchgeführt, das
Sulphydrylgruppen (-SH) aufweist oder an einen solche Gruppen
enthaltenden Träger gebunden ist.

25

Man kann beispielsweise folgendermaßen vorgehen, wenn die zu
untersuchende Probe nur aus wenigen Millilitern Blut besteht:
Die Erythrocyten werden lysiert, und die DNA wird nach übli-
chen Methoden extrahiert. Sodann wird eine kleine Menge der er-
30 haltenen DNA, beispielsweise 1 bis 100 μ g, mit 0,1 - 0,3 N NaOH denatu-
riert, die Lösung anschließend neutralisiert und auf einen pH-
Wert von 7 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit dem der gesuchten DNA oder dem
DNA-Fragment entsprechenden Indikator versetzt, und zwar etwa
35 1 μ g Indikator pro 100 μ g denaturierte DNA (die Menge der gebrauchten
NaOH richtet sich nach dem Anteil der gesuchten DNA in der zu analysierender

- 1 Probe). Die Lösung wird sodann mit Salzen versetzt, um ein hohes Ionenmilieu zu erreichen, nämlich mit mindestens 0,3 in Gegenwart von 50 % Formamid und eines Chelatbildners in geringer Konzentration. Das Volumen soll vorzugsweise gering sein.
- 5 Die Hybridisierung kann sodann bei der hierfür üblichen Temperatur 1 bis 40 Stunden (normalerweise 16 Stunden) durchgeführt werden. Man kann auch die Methode nach Manning (a.a.O.) oder andere Hybridisierungsmethoden anwenden, beispielsweise die Methode nach Kohne et al (Biochemistry, Bd. 16 (1977), S. 5329 - 5341), die bei der hierfür üblichen Temperatur in einer phenolhaltigen Emulsion durchgeführt wird.

Anschließend wird an ein Enzym, beispielsweise die β -Galactosidase, gebundenes Avidin zugesetzt, und zwar unter Bedingungen, welche die Bindung des Biotins am Indikator an die freien Gruppen des Avidins des Komplexes ermöglichen.

Der nicht hybridisierte Indikator wird anschließend vom hybridisierten Indikator nach üblichen Methoden abgetrennt, beispielsweise durch Ausfällen mit Polyäthylenglykol, Gelchromatographie beispielsweise mit Sepharose, oder Ultrazentrifugieren.

- 20 Andererseits kann der nicht hybridisierte Indikator vor der Bindung des Avidins, welches das Enzym mit den an den hybridisierten Indikator gebundenen Biotingruppen trägt, an die DNA abgetrennt werden.

Man kann das gegebenenfalls fixierte Enzym und dementsprechend 25 die gegebenenfalls stattfindende effektive Hybridisierung des Indikators mit der untersuchten DNA nachweisen, indem man ein Enzymsubstrat, insbesondere Orthonitrophenolgalactosid (ONPG), mit der Lösung in Berührung bringt.

- Sobald die Versuchsbedingungen festgelegt sind, ist es natürlich 30 möglich, eine meßbare Aktivitätsschwelle zu bestimmen, beispielsweise durch eine kolorimetrische oder fluorographische Methode. Oberhalb dieser Schwelle kann auf die Anwesenheit der gesuchten DNA oder des DNA-Fragments in der behandelten Probe geschlossen werden.

35

Das nachstehend beschriebene im Labor durchgeführte Versuchsbei-

1 spiel dient zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens.
Es liegt im Rahmen des handwerklichen Könnens, die Methoden
im Hinblick auf die untersuchte biologische Probe und die ge-
suchte DNA oder das DNA-Fragment entsprechend abzuwandeln.

5

Versuchsbeispiel

Der Versuch dient dem Nachweis einer Maus-DNA durch Hybri-
disierung dieser DNA mit ribosomaler Maus-RNA als Indikator.
100 µg Maus-DNA pro 100 µl wäßrige Lösung werden durch Ver-
10 setzen mit 10 µl 1 M NaOH denaturiert. Nach 10 Minuten wird
die Lösung mit 10 µl 1,5 M Natriumphosphorsäure (NaH_2PO_4) ver-
setzt und auf einen neutralen pH-Wert eingestellt. Die dena-
turierte DNA-Lösung wird sodann mit 1 µg ribosomaler RNA, die
mit Biotin mittels Cytochrom C (hergestellt nach der Methode
15 von Manning et al.) markiert ist, versetzt. Das Volumen wird
mit Wasser auf 160 µl gebracht. Dann werden 40 µl einer Mine-
ralsalzlösung in einer Konzentration von 20 x SSC (Standard
Saline Citrate) und 200 µl redestilliertes oder deionisiertes
Formamid zugegeben. Die Lösung 1 x SSC ist eine wäßrige Lösung
20 von 0,15 M NaCl und 0,015 M Natriumcitrat, bei einem pH-Wert von
7,0. Das Gemisch wird 16 Stunden bei üblicher Temperatur in-
kubiert, dann bei 4°C gegen 2 x SSC dialysiert und anschließend
8 Stunden gegen 500 ml Pufferlösung, die 0,1 M Phosphat, 1 M
NaCl und 0,01 M Äthylendiamintetraessigsaures Natrium (EDTA) enthält,
25 bei einem pH-Wert von 7,0 dialysiert. Letztere Dialyse wird
zweimal wiederholt und je 8 Stunden durchgeführt. Die erhalte-
ne Lösung wird eine Stunde bei üblicher Temperatur mit pank-
reatischer Ribonuclease inkubiert. Die Ribonuclease-Konzen-
tration beträgt 10 µg/ml. Durch diese Behandlung kann nicht
30 hybridisierte RNA abgebaut werden.

Sodann werden 1 mg/ml Cytochrom C-Lösung und 1 µl einer Lösung,
die in 1 mg/ml Avidin und 2 mg/ml β-Galactosidase enthält, zu-
gegeben. Dabei erweist sich, daß eines von 7 Molekülen β-Ga-
lactosidase an Avidin gebunden ist. Die Lösung wird gerührt
35 und sodann 4 Stunden bei 4°C stehengelassen.

Anschließend wird mit Phosphat-Dialysepuffer auf 10 ml ver-
dünnt, und die erhaltene Lösung wird eine Stunde bei 35 000

1 U/Min. zentrifugiert (im Beckman Rotor SW 41). DNA- und RNA-Hybride
finden sich im Niederschlag zusammen mit den an diese RNA ge-
bundenen Avidin- β -Galactosidase-Komplexen. Der Überstand ent-
hält nicht hybridisierte und durch Ribonuclease abgebaute RNA sowie
5 ungebundene Avidin und β -Galactosidase.

Der Niederschlag wird abgetrennt und erneut in 10 ml Pufferlösung
suspendiert und zentrifugiert. Anschließend wird der Nieder-
schlag in 0,5 ml Puffer aufgenommen (Tube Nr. 1). Sodann wird
die Aktivität der β -Galactosidase beim Umsetzen des Substrats
10 ONPG nach der Methode von Miller (Experiments in bacterial gene-
tics (1972), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,
New York, USA) durch Messung der optischen Dichte der
Lösung bei 420 m μ bestimmt, und zwar nach mindestens 30-minü-
tiger Inkubation bei 37°C. Es werden unter genauer Einhaltung
15 der vorgenannten Bedingungen Kontrollproben hergestellt, wobei
jedoch beim ersten Kontrollversuch die Zugabe der ribosomalen
RNA (Tube Nr. 2) und beim zweiten Kontrollversuch die Zugabe
der Maus-DNA (Tube Nr. 3) weggelassen wird. Die Ergebnisse
sind in der Tabelle zusammengefaßt.

20

<u>Tabelle</u>			
Tube Nr.	Inhalt		optische Dichte bei 420 m μ , nach 30 Min., bei 37°C
	DNA	RNA	
25			
1	+	+	0,45
2	+	-	0,14
3	-	+	0,15

30

*
+ und - in der DNA- und RNA-Spalte deuten jeweils an, ob die
DNA bzw. RNA in der ursprünglichen Lösung vorhanden war oder
nicht.

35 Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die in der (das Hybrid
enthaltenden) Tube Nr. 1 gemessene optische Dichte signifi-
kant höher ist als bei den Kontrollproben.

- 1 Das Versuchsbeispiel erläutert also die Bedingungen, unter denen die gegebenenfalls anwesende DNA bzw. das DNA-Fragment nachgewiesen werden kann, sofern ein komplementärer Indikator dieser DNA bzw. des DNA-Fragments verfügbar ist, und zwar
5 durch eine einfache Methode, die weder kompliziertes Labormaterial noch besonders große fachmännische Erfahrung erfordert.

- Das erfindungsgemäße Verfahren kann bei diagnostischen in vitro-Verfahren zum Nachweis verschiedener Viren, wie Herpes,
10 Epstein Barr, Pox-Virus, Cytomegalo, in biologischen Proben (wie Blutproben, Stuhlproben) besonders vorteilhaft angewandt werden. Es kann ferner für die Diagnose bestimmter chromosomaler Anomalien angewandt werden.
- 15 Das erfindungsgemäße Verfahren kann weiterhin zur Feststellung der bakteriellen Diagnose, insbesondere bei Trägern pathogener Gene, seien sie exprimiert, nicht exprimiert oder latent, angewandt werden.
- 20 Für den Fachmann liegt es auf der Hand, daß man beim Suchen einer infektiösen DNA rasch auf den Erkrankungsgrad einer erfindungsgemäß behandelten biologischen Probe im Hinblick auf die gesuchte Nukleinsäure bzw. deren Fragmente schließen kann, wenn keine Induzierung oder zumindest keine Überschreitung der
25 Aktivitätsschwelle auf dem farbigen Substrat festgestellt wird, sei es durch Versuche sei es durch Vergleich mit den virusfreien Kontrollproben.

- Umgekehrt kann die festgestellte nicht vorhandene Aktivität
30 hinsichtlich des farbigen Substrats, insbesondere oberhalb der vorgenannten Schwelle, in einem anderen bereits angesprochenen Bereich Anwendung finden: Sie kann die Anwesenheit einer Anomalie gesuchter chromosomaler Abnormität durch die festgestellte nicht vorhandene gesamte oder partielle Hybridisierung zwischen
35 Indikator und untersuchter DNA anzeigen.

Beispielsweise kann man für medizinische Labors

- 1 Reagenzsätze ("Kit") mit allen zur Durchführung des
erfindungsgemäßen Verfahrens notwendigen Reagentien zur Ver-
fügung stellen. Solche Reagenzsätze können insbesondere
Muster für Indikatoren enthalten, die beispielsweise den DNA von
5 gut erforschten pathogenen Viren oder Bakterien entsprechen, und
sogar für Indikatoren, die den besonderen Genen entsprechen, die
normalerweise in biologischen zu untersuchenden Proben wie Blut
enthalten sind.
- 10 Wie bereits erwähnt, sollte der modifizierte Indikator vorzugs-
weise ein Indikator sein, an den Biotin gebunden ist und wobei
das modifizierte Enzym, beispielsweise die β -Galactosidase,
selbst an das Avidin gebunden ist.
- 15 Die Erfindung betrifft weiterhin neue
Komplexe aus einem Enzym (dessen Aktivität im Hinblick auf
insbesondere ein farbiges Substrat nachgewiesen werden kann)
und einem Indikator (RNA oder einzelsträngige DNA), sei es die
Bindung erfolgt direkt, sei es mit Hilfe eines komplexbildenden Mittels
20 zur industriellen Verwendung. Sie betrifft auch den Komplex aus Enzym und
mindestens einem chemischen Molekül, wobei der ganze Komplex an einen ge-
gebenenfalls modifizierten Indikator (RNA oder DNA) gebunden
werden kann, der selbst mit einer DNA bzw. einem DNA-Fragment hybri-
disierbar ist. Solche neue industrielle Produkte sind bei-
25 spielsweise die Komplexe aus Indikator (RNA oder DNA) und einem
Enzym, wie die β -Galactosidase, oder die Komplexe
aus Avidin bzw. Biotin und einem solchen Enzym.

Die Erfindung kann noch in anderen Bereichen Anwendung finden,
30 insbesondere bei der Markierung bestimmter DNA-Fragmente in
bekannten genetischen Versuchen zur Bestimmung des Genotyps
der in Frage stehenden DNA. Sie kann insbesondere Anwendung
finden bei der Bestimmung, ob ein besonderes DNA-Fragment in
genetischen Ausleseversuchen inkorporiert ist oder nicht. Bei
35 diesen Ausleseversuchen geht es beispielsweise um Transforma-
tionen von Zellen mittels fremder DNA, die das betreffende DNA-
Fragment enthält, oder aber um Transduktionsversuche, bei denen

1 DNA-Fragmente, die normalerweise in der zellulären DNA enthalten sind, in die virale DNA übergehen, mit der die Zellen infiziert worden sind. Eine solche Anwendung ist natürlich nur möglich, wenn man über einen Indikator verfügt, der das kom-
5 plementäre RNA- bzw. DNA-Fragment des Fragments der gesuchten Nukleinsäure ist.

Die vorliegende Erfindung erschöpft sich keineswegs in den erläuterten Anwendungs- und Durchführungsmöglichkeiten. Sie um-
10 faßt vielmehr alle Varianten, insbesondere hinsichtlich Modifizierungen des Indikators, die eine enzymatische Dosierung des Hybrids ermöglichen, sowie die Modifizierungen hinsichtlich der Bildung und/oder Reinigung des Hybrids, der Markierung oder chemischen Modifizierung der untersuchten DNA selbst, und zwar
15 unter den vorgenannten Bedingungen, wobei beim RNA-Indikator keine besondere Markierung vorgenommen wird. Eine Umkehrung der Reagentien kann beispielsweise im Falle einer DNA in Betracht gezogen werden, die zahlreiche repetitive Gene enthält, welche aus der gesamten DNA in Form des Hybrids mit dem Indikator iso-
20 liert werden sollen. Vorher wird die DNA durch übliche Methoden fragmentiert.

25

Gemäß einer anderen Ausführungsform kann man das Verfahren zum Nachweis des Hybrids aus der gesuchten DNA und dem Indikator, mittels eines an ein Enzym, beispielsweise die β -Galactosidase, gebundenen Antihybrid-Antikörpers anwenden.

30

35

IGEN INTERNATIONAL, INC.

VOSSIUS & PARTNER

Patentanwälte

Copy

Vossius & Partner POB 86 07 67 81634 München Germany

Enzo Biochem, Inc.
Patent Department
Attn.: Ronald C. Fedus, Esq.
527 Madison Avenue
9th Floor

NEW YORK, NY 10022
U.S.A.

EP-Patent No. 0 286 898
ENZO BIOCHEM, INC.
Your Ref.: Enz-5 (Div. 4) (EPO)
Our Ref.: S 458 EP/IV

Dear Ronald,

Please be informed that we have just received the enclosed two Notices of Opposition which have been filed against the above-mentioned European patent by

- bioMérieux, Inc. (OI) and
- Igen International, Inc. (OII).

The EPO has not yet set a term for filing a reply to the opposition letters but will notify us of the filing deadline after the oppositions have been examined for formal requirements.

We will keep you informed.

Very truly yours,


Dr. Renate Barth

Encl.
2 Notices of Opposition

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
Dr. VOLKER VOSSIUS, Dipl.-Chem.
(bis 1992; danach in anderer Kanzlei)
Dr. PAUL TAUCHNER, Dipl.-Chem.
Dr. DIETER HEUNEMANN, Dipl.-Phys.
Dr. PETER A. RAUH, Dipl.-Chem.
Dr. GERHARD HERMANN, Dipl.-Phys.
JOSEF SCHMIDT, Dipl.-Ing.
Dr. HANS-RAINER JAENICHEN, Dipl.-Biol.
Dr. ALEXA VON UEXKÜLL, M.Sc.
Dr. RUDOLF WEINBERGER, Dipl.-Chem.
Dr. WOLFGANG BUBLAK, Dipl.-Chem.
AXEL STELLBRINK, Dipl.-Ing.
Dr. JOACHIM WACHENFELD, (Biol.)
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
Dr. RENATE BARTH, Dipl.-Chem.
Dr. URSULA ENGLBRECHT, Dipl.-Chem.
RECHTSANWÄLTE
HELGA TREMMEL
BARBARA GUGGENMOS, Dipl.-Chem.

SIEBERTSTRASSE 4
81675 MÜNCHEN
GERMANY
TELEFON: +49-89-41 30 40
FAX: +49-89-41 30 41 11 (G3/G4)
+49-89-41 30 44 00 (G3)
(Marken - Trademarks)
E-MAIL: info@vossiusandpartner.com

February 18, 1999
Ba/ne

VOSSIUS & PARTNER

Patentanwälte

Copy

Vossius & Partner POB 86 07 67 81634 München Germany

Enzo Biochem, Inc.
Patent Department
Attn.: Ronald C. Fedus, Esq.
527 Madison Avenue
9th Floor

NEW YORK, NY 10022
U.S.A.

REC'D FEB 22 1999

EP-Patent No. 0 286 898
ENZO BIOCHEM, INC.
Your Ref.: Enz-5 (Div. 4) (EPO)
Our Ref.: S 458 EP/IV

Dear Ronald,

Please be informed that we have just received the enclosed two Notices of Opposition which have been filed against the above-mentioned European patent by

- bioMérieux, Inc. (OI) and
- Igen International, Inc. (OII).

The EPO has not yet set a term for filing a reply to the opposition letters but will notify us of the filing deadline after the oppositions have been examined for formal requirements.

We will keep you informed.

Very truly yours,



Dr. Renate Barth

Encl.
2 Notices of Opposition

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
Dr. VOLKER VOSSIUS, Dipl.-Chem.
(bis 1992: danach in anderer Kanzlei)
Dr. PAUL TAUCHNER, Dipl.-Chem.
Dr. DIETER HEUNEMANN, Dipl.-Phys.
Dr. PETER A. RAUH, Dipl.-Chem.
Dr. GERHARD HERMANN, Dipl.-Phys.
JOSEF SCHMIDT, Dipl.-Ing.
Dr. HANS-RAINER JAENICHEN, Dipl.-Biol.
Dr. ALEXA VON UEXKÜLL, M.Sc.
Dr. RUDOLF WEINBERGER, Dipl.-Chem.
Dr. WOLFGANG BUBLAK, Dipl.-Chem.
AXEL STELLBRINK, Dipl.-Ing.
Dr. JOACHIM WACHENFELD, (Biol.)
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
Dr. RENATE BARTH, Dipl.-Chem.
Dr. URSULA ENGLBRECHT, Dipl.-Chem.
RECHTSANWÄLTE
HELGA TREMMEL
BARBARA GUGGENMOS, Dipl.-Chem.

SIEBERTSTRASSE 4
81675 MÜNCHEN
GERMANY
TELEFON: +49-89-413040
FAX: +49-89-41304111 (G3/G4)
+49-89-41304400 (G3)
(Marken - Trademarks)
E-MAIL: info@vossiusandpartner.com

February 18, 1999
Ba/ne

VOSSIUS & PARTNER

Patentanwälte

Copy

Vossius & Partner POB 86 0767 81634 München Germany

Enzo Biochem, Inc.
Patent Department
Attn.: Ronald C. Fedus, Esq.
527 Madison Avenue
9th Floor

NEW YORK, NY 10022
U.S.A.

EP-Patent No. 0 286 898
ENZO BIOCHEM, INC.
Your Ref.: Enz-5 (Div. 4) (EPO)
Our Ref.: S 458 EP/IV

Dear Ronald,

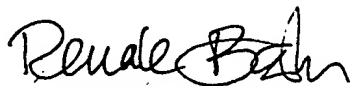
Please be informed that we have just received the enclosed two Notices of Opposition which have been filed against the above-mentioned European patent by

- bioMérieux, Inc. (OI) and
- Igen International, Inc. (OII).

The EPO has not yet set a term for filing a reply to the opposition letters but will notify us of the filing deadline after the oppositions have been examined for formal requirements.

We will keep you informed.

Very truly yours,



Dr. Renate Barth

Encl.
2 Notices of Opposition

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
Dr. VOLKER VOSSIUS, Dipl.-Chem.
(bis 1992: danach in anderer Kanzlei)
Dr. PAUL TAUCHNER, Dipl.-Chem.
Dr. DIETER HEUNEMANN, Dipl.-Phys.
Dr. PETER A. RAUH, Dipl.-Chem.
Dr. GERHARD HERMANN, Dipl.-Phys.
JOSEF SCHMIDT, Dipl.-Ing.
Dr. HANS-RAINER JAENICHEN, Dipl.-Biol.
Dr. ALEXA VON UEXKÜLL, M.Sc.
Dr. RUDOLF WEINBERGER, Dipl.-Chem.
Dr. WOLFGANG SUBLAK, Dipl.-Chem.
AXEL STELLBRINK, Dipl.-Ing.
Dr. JOACHIM WACHENFELD, (Biol.)
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
Dr. RENATE BARTH, Dipl.-Chem.
Dr. URSULA ENGLBRECHT, Dipl.-Chem.
RECHTSANWÄLTE
HELGA TREMMEL
BARBARA GUGGENMOS, Dipl.-Chem.

SIEBERTSTRASSE 4
81675 MÜNCHEN
GERMANY
TELEFON: +49-89-4130 40
FAX: +49-89-4130 4111 (G3/G4)
+49-89-4130 44 00 (G3)
(Marken - Trademarks)
E-MAIL: info@vossiusandpartner.com

February 18, 1999
Ba/ne

NOTICE OF OPPOSITION AGAINST A EUROPEAN PATENT

Tabulation marks

I. PATENT OPPOSED <div style="font-size: 48px; text-align: center; border: 2px solid black; border-radius: 50%; width: 150px; height: 150px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 0 auto;">02</div>		for EPO only	
		Opp. No.	OPPO (1)
		Patent No.	EP 286 898
		Application No.	88 104 963.9
Date of mention of the grant in the European Patent Bulletin (Art. 97(4), 99(1) EPC)		29.04.1998	
Title of the invention: Modified labeled nucleotides and poly-nucleotides and methods of preparing,utilizing and detecting same.			
II. PROPRIETOR OF THE PATENT Enzo Biochem., Inc. New York, N.Y. 10013, U.S.A. first named in the patent specification			
Opponent's or representative's reference (max. 15 spaces)		76 099 m5/bk	OREF
III. OPPONENT	Name		Igen International Inc.
	Address		16020 Industrial Drive Gaithersburg, Maryland 20877 U.S.A.
	State of residence or of principal place of business		
	Telephone/Telex	001 301 9848000	001 301 230 0158
	Multiple opponents	<input type="checkbox"/> further opponents see annex	<input type="checkbox"/>
IV. AUTHORISATION	1. REPRESENTATIVE (Name only one representative to whom notification is to be made)		
	Name		
	Address of place of business		
	Telephone/Telex		
	Additional representative(s)		
	2. EMPLOYEE(S) of the opponent authorised for these opposition proceedings under Art. 133(3) EPC		
	AUTHORISATION(S) to 1./2.		
	Name(s):		
<input type="checkbox"/> is/are enclosed			
<input type="checkbox"/> has/have been registered under No.			

<p>V. Opposition is filed against</p> <p>— the patent as a whole X</p> <p>— the claims No. </p>	<p>for EPO only</p>
<p>VI. GROUNDS FOR OPPOSITION:</p> <p>Opposition is based on the following grounds:</p> <p>(a) the subject-matter of the European patent opposed is not patentable (Art. 100(a) EPC) because:</p> <p style="margin-left: 20px;">— it is not new (Art. 52(1); 54 EPC). X</p> <p style="margin-left: 20px;">— it does not involve an inventive step (Art. 52(1); 56 EPC), X</p> <p style="margin-left: 20px;">— patentability is excluded on other grounds, </p> <p style="margin-left: 100px;">i. e. Art.</p> <p>(b) the patent opposed does not disclose the invention in a manner sufficiently clear and complete for it to be carried out by a person skilled in the art (Art. 100(b), EPC; see Art. 83 EPC) X</p> <p>(c) the subject-matter of the patent opposed extends beyond the content of the application/the earlier application as filed (Art. 100(c) EPC; see 123(2) EPC) X</p>	
<p>VII. FACTS and ARGUMENTS (Rule 55(c) EPC)</p> <p>presented in support of the opposition are submitted herewith on a separate sheet (annex 1) X</p>	
<p>VIII. ORAL PROCEEDINGS</p> <p>— are requested for the event that the patent opposed is not to be revoked as requested on the written submissions. </p> <p>— are — presently — not requested. </p>	
<p>IX. OTHER REQUESTS:</p> <p>If the Opposition Division is not inclined to revoke the patent, it is requested to hold Oral Proceedings.</p>	

X. EVIDENCE presented

A. Publications:

SEE ATTACHED LIST

(cited in patent specification,
therefore not enclosed) =

2

(enclosed) =

X

(neither cited in patent specification
nor enclosed) =

0

for EPO only

Date of public./
available (R.59)

1 Relates to claim(s) No.

Particular relevance (page, column, line, fig.):

2 Relates to claim(s) No.

Particular relevance (page, column, line, fig.):

3 Relates to claim(s) No.

Particular relevance (page, column, line, fig.):

4 Relates to claim(s) No.

Particular relevance (page, column, line, fig.):

5 Relates to claim(s) No.

Particular relevance (page, column, line, fig.):

Continued on separate sheet (annex 2)

B. Other evidence:

Continued on separate sheet (annex 2)

XI. PAYMENT OF OPPOSITION FEE is made

for EPO only



as indicated in the enclosed voucher for settlement of fees (EPO Form 1010)



XII. LIST OF ENCLOSED DOCUMENTS

Encl-
sure No.

No. of copies

0



Copies of this form for notice of opposition

(min. 1)

1



Facts and arguments (see VII.)

(min. 2)

2



Separate indication of further evidence (see X)

(min. 2)

Copies of documents presented as evidence (see X):

3a



— Publications



(min. 2 of each)

3b



— Other documents

(min. 2 of each)

4



Signed authorisation(s) (see IV)

5



Voucher for the settlement of fees (see XI)

6



Cheque

7



Additional sheet

(min. 2)

8



Receipt for documents (EPO Form 1037)

9



Other (please specify here)

**XIII. SIGNATURE
of opponent or representative**

H. Kolb

Dr. Helga Kolb

Place **Munich**

Date **29 January 1999**

Please type name under signature. In the case of legal persons, the position of the signer within the company should also be typed.

Opposition vs. EP 286 898 B1
Proprietor: Enzo Biochem, Inc.
Opponent: Igen International Inc.

Our Ref.: 76 099 m5/bk
Munich, 29 January 1999

Facts and Arguments

In support of the opposition lodged by Igen, Inc. against EP 0 286 898 by Enzo Biochemical, Inc.:

I Prior Art

- D1** Daniel, F.B. and Beerman, E.J., Biochemistry 15 (1976), 565-568
- D2** EP 0 063 879
- D3** Eberhard W. et al., Nucleic Acids Research 9 (1981);
- D4** Saffhill, R. and Hall, J.J., Carbohydrates Nucleosides Nucleotides 8 (1981), 573-583
- D5** Broker T.R., et al., Nucleic Acids Research 5 (1978)
- D6** US-A-4,260,737
- D7** DE-PS 29 15 082
- D8** Baumann, J.G.J. et al., Chromosome (Berl.) 84 (1981), 1-18
- D9** Broker, T.R. et al., Nucleic Acids Research, 5 (1978), 363-384
- D10** Halloran, M.J. et al., J. Immunology, 96 (1966), 373-378
- D11** Erlanger, B.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 52 (1964), 68-74
- D12** Suzuki, S. et al., Bioinorganic Chemistry 3 (1974), 281- 293

II

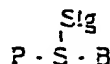
The Invention of the Opposed Patent

European patent EP 0 286 898 (hereinafter named "the opposed patent") relates to nucleotides which are modified capable of incorporation into nucleic acids and once incorporated in nucleic acids, the modified nucleotides do not significantly interfere with the formation or stabilization of the double helix formed of the resulting nucleic acids containing modified nucleotides.

The opposed patent further deals with various methods in the field of biochemistry where the formation of the above labelled double helix is used as a detection or determination of a specific DNA.

The claims of the opposed patent reflect the subject matter claimed in detail:

1. A nucleotide having the formula



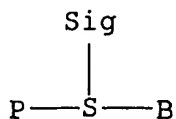
wherein P is a phosphoric acid moiety, S is a sugar moiety and B is a pyrimidine, purine or 7-deazapurine moiety, P being attached at the 2', 3' and/or 5' position of S, B being attached to the 1' position of S from the N1 position when B is a pyrimidine or the N9 position when B is a purine or 7-deazapurine, and Sig is covalently attached to S directly or through a linkage group and represents a moiety which is detectable when said nucleotide is incorporated into a double-stranded nucleic acid duplex, Sig being a monosaccharide, polysaccharide or oligosaccharide or an electron dense component, a magnetic component, an enzyme component, a radioactive component, a catalytic metal component, a fluorescent component, a chemiluminescent component or an antigen, hapten or antibody component.

2. The nucleotide of claim 1 wherein Sig is a sugar residue and said sugar residue is complexed with or attached to a sugar or polysaccharide binding protein.
3. A nucleotide according to claim 1 or 2 which is a deoxyribonucleotide wherein Sig is attached to the C3' or the C5' position of S.
4. A nucleotide according to claim 1 or 2 which is a ribonucleotide wherein Sig is attached to the C2' or the C3' position of S.
5. A polydeoxyribonucleotide or polyribonucleotide comprising at least one nucleotide in accordance with claim 1 or 2.
6. A polydeoxyribonucleotide or polyribonucleotide comprising at least one nucleotide of claim 1 or 2 wherein said polydeoxyribonucleotide or polyribonucleotide is attached to a polypeptide.
7. The polydeoxyribonucleotide or polyribonucleotide of claim 6 wherein said polypeptide is terminally attached thereto.
8. The polydeoxyribonucleotide or polyribonucleotide of claim 6 or 7 wherein said polypeptide has at least one biotin, iminobiotin, antibiotin, antiiminobiotin, avidin, streptavidin or enzyme attached thereto.
9. A nucleotide in accordance with claim 1 wherein Sig includes an antigenic or hapten component capable of complexing with an antibody specific to said component.
10. Use of a nucleotide or polynucleotide according to one of the preceding claims for the manufacture of a chemo-

therapeutic agent for inhibiting RNA and/or DNA synthesis or function in an organism.

11. Use of a nucleotide or polynucleotide according to one of the preceding claims for the manufacture of a stimulating or inducing agent for the stimulation or induction of cells for the production of lymphokines, cytokines and/or interferon.
12. A method of detecting a first compound which includes a nucleotide in accordance with claim 1 as part of said first compound, which comprises contacting said first compound with a second compound capable of forming a complex therewith under suitable conditions so as to form said complex, said complex comprising said first compound and said second compound and detecting said complex.
13. A method of determining the presence of a deoxyribonucleic or ribonucleic acid molecule which comprises forming a double-stranded hybrid polynucleotide duplex which includes a single strand of deoxyribonucleic acid or ribonucleic acid corresponding to or derived from said deoxyribonucleic or ribonucleic acid molecule and has incorporated into its structure a nucleotide in accordance with claim 1 and detecting said duplex.
14. A method of detecting the presence of a nucleic acid-containing etiological agent in a subject which comprises obtaining a suitable sample from said subject, detecting the presence in said sample of a deoxyribonucleic or ribonucleic acid naturally associated with said etiological agent by forming under suitable conditions a double-stranded polynucleotide duplex which has incorporated into its structure a compound in accordance with claim 1 and a single strand of deoxyribonucleic or ribonucleic acid corresponding to or derived from said deoxyribonucleic or ribonucleic acid which is naturally associated with said etiological agent and detecting the presence of said double-stranded polynucleotide duplex.
15. A method of testing a bacterium to determine its resistance to an antibiotic which comprises preparing a polynucleotide complementary to the deoxyribonucleic acid gene sequence of said bacterium which confers resistance of said bacterium to said antibiotic and which includes a nucleotide in accordance with claim 1 incorporated therein, contacting said polynucleotide under suitable conditions with a deoxyribonucleic acid obtained from said bacterium so as to form a double-stranded hybrid duplex and detecting the presence of said duplex, the detection of said duplex indicating resistance of said bacterium to said antibiotic and the absence of said duplex indicating the susceptibility of said bacterium to an antibiotic.
16. A method of diagnosing a genetic disorder in a subject which comprises preparing a polynucleotide complementary to the deoxyribonucleic acid gene sequence of said subject which is associated with said genetic disorder and includes a compound in accordance with claim 1 incorporated therein, contacting said polynucleotide under suitable conditions with deoxyribonucleic acid obtained from said subject so as to form a double-stranded hybrid duplex and detecting the presence of said hybrid duplex, the presence or absence of said hybrid duplex indicating the presence or absence of said genetic disorder.
17. A method of diagnosing thalassemia in a human subject which comprises preparing a polynucleotide complementary to the deoxyribonucleic acid gene sequence which is absent in β -minus-thalassemia subjects and having incorporated into their structure a nucleotide in accordance with claim 1, contacting said polynucleotide under suitable conditions with deoxyribonucleic acid obtained from said subject so as to form a double-stranded hybrid duplex and determining the presence of said duplex, the absence of said duplex indicating the presence of β -minus-thalassemia.
18. A method of chromosomal karyotyping which comprises preparing a series of modified polynucleotides corresponding to a series of defined genetic sequences located on chromosomes, said polynucleotides having incorporated into their structure one or more compounds in accordance with claim 1, contacting said polynucleotides with deoxyribonucleic acid of or obtained from chromosomes so as to form hybrid duplexes and detecting said duplexes, thereby determining the location of said duplexes on said chromosomes and the location of said genetic sequences on said chromosomes.

In particular, the nucleotide as claimed in the opposed patent has the formula:



wherein P is a phosphoric acid moiety, S is a sugar moiety and B is a pyrimidine, purine or 7-deazapurine moiety, P being attached at the 2', 3' and/or 5'-position of S, B being attached to the 1' position of S from the N1 position when B is a pyrimidine or the N9 position when B is a purine or 7-deazapurine, and Sig is covalently attached to S directly or through a linkage group and represents a moiety which is detectable when said nucleotide is incorporated into a double-stranded nucleic acid duplex, Sig being a monosaccharide, polysaccharide or oligosaccharide or an electron dense component, a magnetic component, an enzyme component, a radioactive component, a catalytic metal component, a fluorescent component, a chemiluminescent component or an antigen hapten or antibody component.

The nucleotides defined are non-disruptively modified and nucleic acids containing such nucleotides are capable of forming a double helix arrangement.

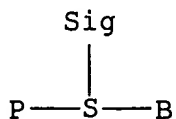
III

Entitlement to Priority

The opposed patent claims a priority on the basis of a US application 391440 filed on 23 June 1982.

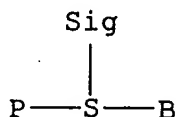
The claims as granted are directed to modified nucleotides, polynucleotides comprising said modified nucleotide, the use of the nucleotide or polynucleotide as well as several methods using said modified nucleotide.

The priority document, however, describes the nucleotides characterized by the general formula:



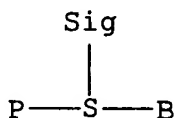
as being ribonucleotides. For instance, page 93, last three lines to page 94, line 14 of the priority document describe the special nucleotides as follows:

"Another special nucleotide in accordance with this invention is characterized by the general formula:



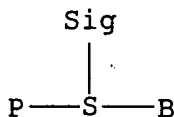
Said nucleotides in accordance with this invention would be characterized as ribonucleotides..... said Sig chemical moiety when attached to said S moiety is capable of signalling itself or making itself self-detecting or is present known and preferably permits the incorporation of the ribonucleotide into its corresponding double-stranded RNA or a DNA-RNA hybrid."

In addition, the claims of the priority document define the compounds having the general formula



as a ribonucleotide. For example, claim 101 reads as follows:

"101. A ribonucleotide having the general formula,

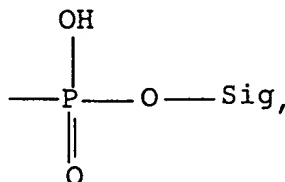


wherein P is the phosphoric acid moiety, S the sugar moiety and B the base moiety, the phosphoric acid moiety being attached at the 2', 3' and/or 5' position of the sugar moiety, said base B being attached from the N1 position or the N9 position to the 1' position of the sugar moiety when said base is a pyrimidine or a purine, respectively, and wherein said Sig is a chemical moiety covalently attached to the sugar S, said Sig, when attached to said sugar S, being capable of signalling itself or making itself self-detecting or its presence known."

All claims referring directly or indirectly to claim 101 (until claim 140) recite the ribonucleotide or polyribonucleotide.

The priority document also provides claims directed to a nucleotide having the general formula P-S-B wherein the moiety Sig may be covalently attached to the P, S or B moiety. However, when Sig is attached to the S moiety, the S moiety is a ribose group. For example, claim 143 is absolutely clear about this specific option:

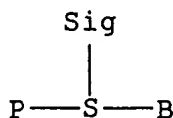
"143. A nucleotide having the general formula P-S-B wherein P is the phosphoric acid moiety, S the sugar or monosaccharide moiety and B the base moiety, said nucleotide having covalently attached to the P or S or B moiety a chemical moiety Sig, said Sig chemical moiety when attached to the P moiety is attached thereto via the chemical linkage



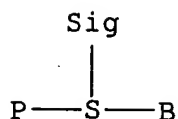
and when Sig is attached to the S moiety, the S moiety is a ribose group, said chemical moiety Sig when attached to said P, S or B being capable of signalling itself or makes itself self-detecting or its presence known."

The priority document itself distinguishes between ribonucleotides and deoxyribonucleotides. On page 92, the general structures together with names are explicitly shown.

Briefly summarizing, the priority document characterizes the nucleotides having the general formula:



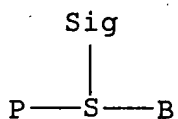
as ribonucleotides. Thus, only ribonucleotides having the general formula:



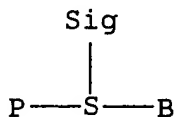
enjoy the priority of 23 June 1982.

IV Addition of New Matter

The claims as granted are directed to nucleotides and polynucleotides having the general formula



The claims as originally filed are directed to a ribonucleotide having the formula



polyribonucleotides containing the modified ribonucleotide and methods of using same. Said claims which mention a nucleotide or polynucleotide, such as claims 2, 7, 9 and 10, are considered to recite a ribonucleotide or polyribonucleotide as they refer to claim 1 defining a ribonucleotide.

In the submission of 3 May 1995 patentee submitted amended claims 1 to 17. The term "ribonucleotide" in the preamble of claim 1 has been changed to "nucleotide". It was argued that this amendment to the claims conform with both the original disclosure and the rest of the claim itself. However, the generalization "nucleotide" is not originally disclosed in the application documents.

In the following it will be shown that patentee's citations to support the generalization of the claims do not provide basis for said generalization:

Last paragraph on page 100: "The special nucleotides of the invention include ... a signalling chemical moiety Sig covalently bound attached thereto, either to a P, S or B moiety." The presently relevant case is that Sig is bound to the S moiety. In this specific case, claim 1 as originally filed characterizes a ribonucleotide".

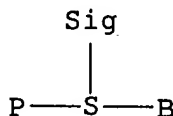
The same situation also applies to patentee's further quotations such as page 103, first paragraph, page 106, page 113, second full paragraph, page 114, first paragraph and page 115.

Based on the above, the generalization as to the nucleotides introduced in granted claims 1 to 18 is not supported by the original disclosure. Thus, claims 1 to 18 comprise new matter and should be revoked on the basis of Arts. 100c and 123(2) EPC.

V Novelty

Novelty of Claim 1

Claims 1 recites a nucleotide having the general formula



wherein P, S, B and Sig have the meanings as mentioned above.

Such a nucleotide, however, is already known from document D1, Daniel, F.B. and Beerman, E.J., Biochemistry 15 (1976), 565-568.

Fig. 2 on page 566 shows dinucleosides monophosphates, ApU (A) and UpA (B) reacted with potassium osmate and 2,2'-bipyridyl to form the expected sugar esters. It can be easily realized that both dinucleoside monophosphates are nucleotides as defined in claim 1. For example, ApU sugar ester (A) is composed of the following components: a phosphoric acid moiety P, a pyrimidine as B, a sugar moiety as S and a Sig which is covalently attached to S and represents a moiety which is detectable when said nucleotide is incorporated into a double-stranded nucleic acid duplex. The 2,2'-bipyridyl osmate is an electron dense component and thus falls into the definition for Sig.

To the extent that the patentee seeks to interpret the claims to encompass oligonucleotides comprising a signal moiety that is directly or indirectly attached to S on one nucleotide by virtue of its attachment to P or B on a different nucleotide of the oligonucleotide prior art directed to such embodiments would be relevant to the novelty of the invention of the opposed patent.

Document D2 relates to poly- and oligonucleotides comprising nucleotides modified at the base by a moiety which is capable of forming a detectable complex with a polypeptide when the compound is incorporated into a double stranded nucleic acid complex. For example, on page 27, lines 1 to 34, such modified nucleotides are shown.

Therefore, document D2 discloses a polypeptide attached directly to B of a nucleotide in a nucleic acid chain and indirectly through B to S on a different nucleotide in the chain. Given such a broad interpretation of the claims of the opposed patent, document D2 is considered to be a novelty destroying document.

Document D2 is also relevant to claims 5 and 6. Page 27 shows a polydioxynucleotide or polyribonucleotide comprising a nucleotide which is modified according to the claim 1 interpretation as outlined above. Further, line 32 on page 27 mentions the possibility of using a polypeptide when the compound is incorporated into a double-stranded duplex.

Document D2 is also applicable to claim 10. On page 43, lines 13 to 21, the particular usefulness of the modified polynucleotides in the field of cancer research is described.

VI Inventive Step

As outlined in the introductory part of the opposed patent, it was already known at the priority date of the opposed patent to produce nucleotides or polynucleotides which are radioactively labelled such as with isotopes or radioactive hydrogen, phosphor, carbon or iodine. The use of radioactive labelled materials, however, presents hazards due to radiation. In order to overcome or avoid the hazards and difficulties associated with radioactively labelled compounds or materials, it has been proposed to chemically label compounds of interest such as nucleotides and polynucleotides using biotin. Biotin-labelled polynucleotides are selectively and quantitatively retained on avidin-sepharose due to the strong affinity of biotin and avidin.

The supposed object of the opposed patent is to provide nucleotides, oligo- or polynucleotides which overcome the problems associated with radioactive labelled nucleotides and oligo- or polynucleotides probes.

The solution proposed in the opposed patent is to provide modified nucleotides suitable for attachment to or incorporation into DNA or other nucleic material. It should be mentioned that the claims as granted still comprise the option to use biotin for labelling the nucleotides and polynucleotides. Further, the examples are preliminarily based on the use of biotin as a label. Thus, the invention of the opposed patent cannot be seen as an inventive development of what was already known at the priority date of the opposed patent.

Inventive Step of Claim 1

Document D7, DE-PS 2915082, is concerned with the same problem. The object of the invention of D7 is to provide a process for the detection of a nucleic acid sequence or a nucleic acid fragment which can be easily carried out.

Document D7 proposes to chemically modify DNA or RNA by labelling nucleotides with biotin. For example, on page 3, lines 12 to 14, reference is made to biotin labelling according to the method of Manning et al., using cytochrome C.

Document D5 deals with the electron microscopic visualization of tRNA genes with ferritin-avidin: biotin levels. Biotin is covalently attached to the 3'-end of tRNA using an $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ bridge.

Further, document D6, US-A-4260737, reports on the radioiodination of aminoacyl-transfer RNAs with either ^{125}I or ^{131}I resulting in the radioactive labelling of specific nucleotides in the tRNA.

Additionally, document D8 relates to the modification of the terminal nucleotide of 5S RNA with a fluorescent moiety. Briefly, RNA was oxidized with periodate which converts the diol of the sugar in the terminal nucleotide to a dialdehyde. The dialdehyde is then coupled to the fluorescent moiety by reaction with thiosemicarbazide. The fluorescent moiety allows for rapid detection of in situ hybrids. In this context, reference

is made, for example to pages 3 and 4, section "Fluorochrome-Labeling of RNA" and section "In situ Hybridisation Procedure".

Similarly, document D9 describes the modification of the terminal nucleotide of tRNA with biotin for indirect electron microscopic visualization and mapping of RNA and other short transcripts hybridized to DNA. As described in the Abstract, biotin was coupled to the terminal nucleotide via the sugar by periodate oxidation followed by coupling biotin to the sugar using a diamine linker moiety. Avidin covalently crosslinked to ferritin was mixed with hybrids containing biotin-labeled tRNA and the complex was detected by electron microscopy to specifically and accurately reveal the position of the tRNA gene.

Documents D10 and D11 describe the coupling of a hapten to the sugar of a nucleotide, substantially as claimed. In reaction 3 of Figure 1, on page 380, document D10 suggests that the sugar of a nucleotide can be modified by a protein in the presence of carbodiimide. Further, document D11 states, for example, on page 69, third full paragraph that the sugar of a ribonucleotide can be coupled to a protein by periodate oxidation and subsequent borohydride reduction.

The modified ribonucleotides of document D11 were immunogenic, such that the proteins attached to the sugar are haptens, substantially as claimed.

Finally, in Figure 4(I) at page 287, document D12 shows the structure of the complex formed upon reaction of a nucleoside with diethylenetriamincobalt(III). The cobalt chelates with the diol of the sugar. Further, at page 291, document D12 states that

"ATP coordinated around cobalt(III) in the form of chelate through the two hydroxy groups at 2'- and 3'-positions of ribose moiety at pH 11.0, as in the Co(III)dien³⁺-nucleoside complexes."

Therefore, at the priority date, it was common knowledge that a variety of labels (fluorescent, heavy metal, chelate, peptide and immunogen) could be employed to label various biological substances. Hence, starting from the known labeled nucleosides/nucleotides or polynucleotides, it was obvious for the skilled person to use the same for the purposes outlined in the opposed patent. The nucleotide as recited in claim 1 is thus not based on an inventive step over any of prior art documents D3 to D12.

Inventive Step of Claim 5

Claim 5 defines a polydeoxyribonucleotide or polyribonucleotide comprising at least one labelled nucleotide as recited in claim 1.

Document D7 describes nucleic acids which are used as indicator by labelling individual nucleotides with biotin. In the examples rRNA is modified with biotin and cytochrom C.

Similarly, document D5 uses biotin to label tRNA.

Further, as discussed above, document D8 relates to the modification of the terminal nucleotide of 5S RNA with a fluorescent moiety and document D8 describes the modification of the terminal nucleotide of tRNA with biotin.

Based on the above, it was known at the priority date of the opposed patent to use biotin or fluorescent molecules as label for specific nucleotides in nucleic acids. Thus, the subject matter of claim 5 is not based on an inventive step.

Inventive Step of Claim 12

Claim 12 is very generally formulated and directed to a method of detecting a first compound to form a complex which is then detected.

Said complex is described in document D7. The first compound corresponds to the modified nucleic acid whereas the second compound is a DNA hybridizing with said indicator DNA. As the formation of such complexes can be easily taken from document D7, the method of claim 12 does not involve an inventive step.

Inventive Step of Claim 13

According to the method of claim 13, a double-stranded hybrid polynucleotide duplex is formed which comprises a DNA or RNA molecule incorporating a nucleotide according to claim 1. Said duplex is then detected.

As already set out in connection with claim 12, such hybrids are well-known from document D7. Reference is made to the example of D6 describing a duplex formation of DNA and biotinylated rRNA. The detection is carried out by the biotin/avidin reaction. Thus, claim 13 is not based on an inventive step over document D7.

Inventive Step of Claim 14

In claim 14 a method is defined of detecting the presence of a nucleic acid-containing ethiological agent in a suitable sample from a subject by forming a double-stranded polynucleotide duplex and detecting the same.

The process of document D7 can be advantageously used in diagnostic *in vitro* processes for the detection of various viruses (see page 4, lines 46 to 48). Thus, the method of claim 14 is not inventive over document D7.

Inventive Step of Claim 15

The method as claimed is a test of a bacterium to determine its resistance to an antibiotic. After forming a double-stranded hybrid duplex consisting of a hybrid DNA and a labelled DNA, the presence of the duplex is detected. Such a process is already suggested in document D7. It is mentioned on page 4, line 50 that the process may be also used for the bacterial diagnosis.

Inventive Step of Claim 16

According to the process of claim 16, diseases associated with genetic disorder may be detected by contacting a polynucleotide hybrid with a labelled DNA. Subsequently, the hybrid duplex formation is detected. The diagnosis of chromosomal anomalies, however, can be also carried out according to the process of D7, see page 4, lines 48/49. Thus, the process of claim 16 is clearly not inventive over D7.

Inventive Step of Claim 17

According to claim 17 a method of diagnosing thalassemia in a human subject is defined by contacting a DNA hybrid with a labelled DNA and detecting the duplex formation. The detection of diseases by using a labelled DNA duplex and detecting the same can be

taken from document D7. It is referred to page 4, lines 46 to 51. Thus, the process of claim 17 is not inventive over D7.

Inventive Step of Claim 18

Claim 18 defines a method of chromosomal karyotyping using labelled hybrid duplexes and detecting the same. The person skilled in the art also learns from document D7 that labelled hybrid duplexes may be used for the detection in the field of chromosomal investigations. It is referred to page 4, lines 48/49. Accordingly, the process of claim 18 is not based on an inventive step over D7.

VII Subclaims

The subject matter of the subclaims is also not appropriate to add inventive matter to the independent claims.

Claim 2: Ribonucleotides having a sugar residue are known from document D3, Eberhard W. et al., Nucleic Acids Research 9 (1981). Phosphorylation of such sugar-ribonucleotides lies within the ordinary skill. For instance, document D3, Saffhill, R. and Hall, J.J., Carbohydrates Nucleosides Nucleotides 8 (1981), 573-583, describes the phosphorylation of nucleotides.

Claims 3 and 4: C^{3'} and C^{5'} glycosylated nucleotides are described in document D3, see formulas 1 and 2 and the sugar shown in Fig. 1.

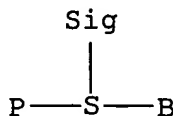
Claims 6 to 8: Biotinylated RNAs are described in D5' and D7.

Summarizing, based on the above, none of claims 1 to 18 of the opposed patent involves an inventive step. The features of the claims are absolutely obvious and a skilled practitioner would not have encountered any difficulty in obtaining the compounds of the claims. The subject matter of the claims would have been arrived at with very expectation of success.

VIII Lack of Disclosure

Should the Opposition Division for any reason acknowledge novelty and inventive step of the subject matter claimed, attention should be given to the following.

The specification of the opposed patent does not show how to prepare a nucleotide as claimed. Specifically, the claims relate to a nucleotide of the formula



wherein the signal moiety is attached to the sugar of the nucleotide. However, at no point in the specification is there a disclosure of how one could make such a nucleotide.

The claimed structure is first presented on page 3 of the specification. In the preceeding paragraph, the specification states:

"The present invention relates to nucleotides which are modified, such as at the 5-position of pyrimidine or the 7-position of purine, preparatory for the preparation therefrom of nucleotide probes suitable for attachment to or incorporation into DNA or other nucleic acid material. In the practices of this invention nucleotides, i.e., nucleic acids, preferably modified in a non-disruptive manner such that the resulting modified nucleotides are capable of incorporation into nucleic acids and once incorporated in nucleic acids the modified nucleotides do not significantly interfere with the formation or stabilization of the double helix formed of the resulting nucleic acids containing the modified nucleotides. The non-disruptive modification of nucleotides is in contrast with those modifications of nucleotides which are characterized as a disruptive modification in the sense that the resulting disruptively modified nucleotides and nucleic acids containing the same block proper double helix formation. In the practices of this invention, the nucleotides are desirably modified at the 5-position of the pyrimidine or the 7-position of the purine. The nucleotides so modified are non-disruptively modified and nucleic acids containing such nucleotides are capable of forming a double helix arrangement." (opposed patent at page 3, lines 38 to 49) (emphasis added)

Therefore, in order to provide an enabling disclosure for the scope of the claims, the specification must provide a minimum of three elements: (1) a method of obtaining a nucleotide having the claimed formula, (2) incorporation of the claimed nucleotide into a nucleic acid, and (3) the formation of a double helix using the nucleic acid of (2). The second and third elements are required to show that the attachment of the signal moiety to the sugar constitutes a non-disruptive modification which enables incorporation of the modified nucleotides into a nucleic acid which is capable of forming a double helix. However, the specification does not provide any guidance as to the preparation of the claimed nucleotides, or their subsequent incorporation into a nucleic acid capable of forming a double helix.

The examples merely describe the incorporation of signal moieties at the base of a nucleotide rather than at the sugar. Indeed, the only example in which the attachment of a polysaccharide signaling moiety to a nucleotide is described, such as that suggested in the claims, appears in Example XXXI at page 18, lines 19 to 32 of the specification of the opposed patent wherein the polysaccharide is attached to the base. There is simply no guidance as to the preparation of the claimed nucleotides, let alone the use of such nucleotides in either single or double stranded nucleic acids. Thus, the specification does not give evidence for the whole breadth of the claims. Consequently, the person skilled in the art would not be able to work the invention. Additionally, reference is made to the relevant Technical Board of Appeal decisions T409/91 and T435/91.

Our request to revoke the patent in its entirety is therefore fully justified.

Opposition vs. EP 286 898 B1
Proprietor: Enzo Biochem, Inc.
Opponent: Igen International Inc.

Our Ref.: 76 099 m5/bk
Munich, 29 January 1999

List of Prior Art Documents

- D1** Daniel, F.B. and Beerman, E.J., Biochemistry 15 (1976), 565-568
- D2** EP 0 063 879
- D3** Eberhard W. et al., Nucleic Acids Research 9 (1981);
- D4** Saffhill, R. and Hall, J.J., Carbohydrates Nucleosides Nucleotides 8 (1981), 573-583
- D5** Broker T.R., et al., Nucleic Acids Research 5 (1978)
- D6** US-A-4,260,737
- D7** DE-PS 29 15 082
- D8** Baumann, J.G.J. et al., Chromosome (Berl.) 84 (1981), 1-18
- D9** Broker, T.R. et al., Nucleic Acids Research, 5 (1978), 363-384
- D10** Halloran, M.J. et al., J. Immunology, 96 (1966), 373-378
- D11** Erlanger, B.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 52 (1964), 68-74
- D12** Suzuki, S. et al., Bioinorganic Chemistry 3 (1974), 281- 293

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM, OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.